动 物 学 研 究 2013，Oct. 34(5): 446−452 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI:10.11813/j.issn.0254-5853.2013.5.0446

文昌鱼全同胞家系建立及早期发育模式与仔鱼存活率的关系

李伟业[1]，王义权[1,2,*]

1. 厦门大学 生命科学学院，福建 厦门 361005
2. 厦门大学 深圳研究院，广东 深圳 518057

摘要：2011 年 3 月 9 日—5 月 19 日，以厦门海域采集的野生个体和实验室繁育的日本文昌鱼成体为亲本，尝试性地建立了全同胞家系；采用温度和光照诱导的方法，对雌、雄亲本进行人工催产，获得了 34 对亲本的全同胞家系受精卵。在家系培育过程中发现致使胚胎和仔鱼死亡的几种主要原因，以及日本文昌鱼早期发育的两种模式。通过加强养护管理，提高仔鱼存活率，缩短幼体变态所需时间，最终建立了 7 个完成变态的全同胞家系。在这些家系中，从受精卵到完成变态后不久的亚成体存活率最高为 32.4%，最低为 1.67%，而变态最快历时 24 d，最慢历时 42 d。虽然在全同胞家系建立过程中，幼体死亡率高，家系间的胚胎和幼体生长发育状况差异大，但实验结果表明日本文昌鱼全同胞家系建立完全可行，为其优良品系选育建立了基础。

关键词：文昌鱼；全同胞家系；繁殖；发育；存活率
中图分类号：Q959.287 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)05-0446-07

Establishment of full-sib families of *Branchiostoma japonicum* and the relationship between early development patterns and larvae survival rates

Wei-Ye LI [1], Yi-Quan WANG [1,2,*]

1. *School of Life Sciences*, *Xiamen University*, *Xiamen* 361005, *China*
2. *Shenzhen Research Institute of Xiamen University*, *Shenzhen* 518057, *China*

Abstract: One general requirement of individual laboratory animals is that they have known genetic backgrounds. However, ensuring such genetic similarity is difficult, and can be facilitated by breeding a full strain for experimentation. To this end, the authors bred 34 full-sib families of amphioxus larvae/embryos. Due to the high mortality of the embryos and larvae, only seven full-sib families of juvenile amphioxus *Branchiostoma japonicum* were obtained. Among them, the highest and lowest survival ratios were 32.4% and 1.67%, respectively, whereas the shortest metamorphosis and longest larva duration were 24 d and 42 d, respectively. These results demonstrate the feasibility of establishing full-sib families of amphioxus, and provide fundamental data needed for the future breeding of amphioxus strains.

Keywords: Amphioxus; Full-sib family; Propagation; Development; Survival ratio

文昌鱼是头索动物亚门（Cephalochordata）动物的总称，现存 30 余种（Poss & Boschung, 1996; Wang & Fang, 2005），广泛分布于世界各地的浅海沙滩，营钻沙、底栖和滤食生活，保留了脊索动物门共同祖先的原始特征，是现生生物中与脊椎动物亚门（Vertebrata）最为相似的无脊椎动物。文昌鱼胚胎发育和躯体结构的基本图式（body plan）与脊椎动物相同，在脊椎动物起源与进化研究中扮演着非常重要的角色，且作为进化和胚胎学研究的绝佳材料，早在上个世纪前叶即已被许多科学家所认

收稿日期：2012-06-26；接受日期：2012-11-06
基金项目：国家高技术研究发展计划（“863”）项目（2008AA092602）；国家自然科学基金项目（30830023）；深圳市科技研发资金项目（JSF201006290026A）
*通信作者（Corresponding author），E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

识。自从 1994 年 Garcia-Fernàndez & Holland 在《自然》杂志上发表论文，首次从基因组结构层次上证明了脊椎动物起源过程中的基因组“两轮加倍”说（two-round duplication hypothesis）之后（Garcia-Fernàndez & Holland, 1994），文昌鱼又再次回到进化和发育生物学家的视野（Holland et al, 2004; Stokes & Holland, 1998）。近年来，越来越多的实验室加入到文昌鱼研究中，从进化生物学、发育生物学和基因功能、人工繁殖以及全基因组测序等方面进行了多层次的研究并取得了一系列重要进展。文昌鱼作为模式动物日趋成熟（Beaster-Jones et al, 2007; Fuentes et al, 2004; Holland & Holland, 2001; Holland & Yu, 2004; Holland & Holland, 2010; Putnam et al, 2008; Wang et al, 2006; Yu et al, 2007; Zhang et al, 2007）。

培育实验室模式动物首先要解决文昌鱼的人工繁殖问题，为此各国研究者们经过多年的努力（Du & Cheng, 1990; Fuentes et al, 2004; Mizuta & Kubokawa, 2004; Stokes & Holland, 1995; Wu et al, 1994; Zhang et al, 2001），终于在 2006 年首次取得了文昌鱼实验室全人工繁育的成功（Wang et al, 2006; Zhang et al, 2007）。随着文昌鱼人工繁殖技术的突破，在人工海水养殖、饵料培养、产卵诱导技术以及养殖设施和养殖方式等方面亦均取得了进展（Wu et al, 1995; Wang et al, 2002; Zhong et al, 2006; Fuentes et al, 2007）。

野生文昌鱼群体遗传多样性高、个体差异大（Zhong, 2009; Li et al, 2010），将其由野生状态培育为实验室模式动物，不仅需要在实验室可控条件下繁殖，还需要培育较纯品系。然而，文昌鱼幼体阶段死亡率高，品系培育难度大，按前人统计，平均一对亲本所产的后代最多仅能存活 5 尾（Courtney, 1975）。自从 2006 年人工繁殖成功后至今尚无关于文昌鱼品系培育的报道。本研究利用实验室长期繁育的日本文昌鱼（*Branchiostoma japonicum*）群体，通过一雌一雄配对繁殖的方式，尝试性地建立全同胞家系，探索提高幼体存活率的最佳方法，为文昌鱼品系培育积累经验和基础数据。

1 材料与方法

1.1 亲本来源

2005—2010 年，从厦门海域陆续采集日本文昌鱼，在实验室内雌、雄混养，自然产卵受精获得实验室繁殖的子代。我们以野生个体及实验室繁殖的日本文昌鱼（*B. japonicum*）作为亲本。2011 年 3 月初，文昌鱼性腺成熟时，挑选体形较大，性腺饱满而健康的个体组成备选亲本群，包括雌鱼 1 122 尾，雄鱼 736 尾。所有备选亲本的种名均参照 Zhang et al（2006）的分类学描述，在解剖镜下逐尾鉴定。将备选雌、雄亲本分别养殖于~20 L 的小桶中，每桶~100 尾。按照本实验室此前报道的养殖方法（Zhang et al, 2007），加强饲喂促使其性腺成熟。

1.2 亲本催产及家系获得

2011 年 3 月 9 日—5 月 19 日，采用温度及光照诱导的方法，对雌、雄亲本进行人工催产。具体操作方法如下：备选亲本在 17~19 ℃低温中养殖≥10 d 后放入 22~25 ℃高温中热激≥24 h；催产前 30~60 min，用同样温度的洁净海水冲洗亲本两次后将每一条亲本单独置于一 250 mL 的小杯中，熄灯于 25 ℃水温中催产；熄灯后每隔 30 min 观察一次，若发现有雌、雄个体同时排精和排卵，及时取出杯中亲鱼，将精、卵人工混合；充气培养~30 min 后，用 150 目网滤出受精卵，转移至盛有新鲜过滤海水的塑料桶中孵化（Zhang, 2007）。至此获得由同一对雌、雄文昌鱼配对所产生的子代为同一家系，以后将单独培养，全过程绝对避免与其他来源的个体混合。

1.3 受精卵孵化及仔鱼饲养管理

受精卵置于容积为 3 L 的深色塑料小桶中孵化，加桶盖遮光，桶底铺一层细沙，盖满桶底即可，水浴加热，气泵充气增氧。为避免家系混杂，各家系分桶培育，严格隔离。在整个孵化和仔鱼饲养过程中，保持各桶内海水温度 25~27 ℃，盐度 25‰~28‰。

文昌鱼受精卵发育至神经胚时即破卵膜而出。在胚胎出膜前，调节充气量至不产生气浪，神经胚出膜后在水中浮游，此时适当增加充气量。幼体开口后及时投喂叉鞭金藻（*Dicrateria* sp.）或等鞭金藻（*Isochrysis* sp.），饵料投喂量视仔鱼生长发育及其摄食情况适时增减。从仔鱼进入 3 鳃裂期开始，每天用 300 目网换水，换水体积视水体清洁程度而定，一般换出桶中~1/3 海水，注意及时清除桶壁附着物，清洗沙层并观察水质变化，若发现水中出现杂虫污染，及时吸去杂虫并更换新鲜海水。进入变态期时停止清洗沙层，及时增加铺沙量至沙层厚度~2 cm，并对密度过高的家系进行分桶养殖，直至

全部仔鱼完成变态潜沙后，再恢复对沙层的清洗。潜沙后饵料仍以金藻为主，佐以少量角毛藻（*Chaetoeeros muelleri*）或新月菱形藻（*Nitzschia closterium*）。亚成体和成体阶段仍保持每天换水，同时注意观察沙层清洁度并及时清洗沙层。

1.4 胚胎及仔鱼生长发育观察

受精 30 min 后在体视镜下抽样观察卵子是否正常受精，以受精膜举起的卵子数占卵子总数的比例估算受精率；从受精之日起，每日在解剖镜下抽样观察，胚胎阶段主要观察胚胎能否正常发育和出膜，以正常出膜的个体数占受精卵总数的比例估算孵化率；神经胚出膜后主要观察开口时间，以开口幼体数量占出膜个体总数的比例估算开口率；开口后到变态前主要记录幼鱼鳃裂数，分别以 3 鳃裂期幼体数量占开口幼体数量的比例计算 3 鳃裂期的存活率，8 鳃裂期幼体数量占 3 鳃裂幼体数量的比例计算 8 鳃裂期的存活率；观察幼鱼摄食情况和变态开始的时间，直至全部幼鱼完成变态，潜入沙中为止，以亚成体数目占 8 鳃裂期幼体数量的比例计算变态率；文昌鱼完成变态后形成围鳃腔和肝盲囊，成为亚成体，潜入沙中生活，以亚成体数量占受精卵总数的比例计算生存率（Zhang, 2007）。

为探讨文昌鱼早期发育模式，从各组配对的卵子受精时开始观察，除去子代未能发育至 8 鳃裂期即已死亡的家系外，记录所有配对所产子代的生长发育情况，用鳃裂数对日龄绘制曲线，以反映子代幼体早期生长发育速度。

2 结 果

2.1 日本文昌鱼全同胞家系的存活与变态

2011 年 3 月 16 日—2011 年 4 月 17 日，先后配对 34 对亲本，其中 27 对亲本的后代先后全部死亡，7 对亲本所产全同胞对家系的子代完成变态并潜入沙中，本文持续统计这 7 个家系亚成体的生长至体长 5~28 mm。各存活家系概况见表 1。

表 1 日本文昌鱼家系繁殖情况及早期发育阶段的生存率

Table 1 Breeding and survival ratio at early development stages of *B. japonicum* full-sib families

家系编号 Family number	亲本来源 Source of parents	受精卵数量 Number of eggs（*n*）	受精率 Fertilization ratio（%）	孵化率 Hatching ratio（%）	早期发育存活率 Early developmental stages survival ration (%)			变态时间(d) Metamorphosis time (d)	变态数量 Metamorphosis number（*n*）	变态率 Metamorphosis ratio（%）	生存率 Overall survival ratio（%）
					开口 mouth-open	3 鳃裂 3 gill slits	8 鳃裂 8 gill slits				
24	野外采集	3300	100	6	50	100	100	26	94	94	2.85
25	野外采集	3200	100	12.50	50	75	66.67	35	70	70	2.19
26	野外采集	10000	100	50	46	100	100	34	2 300	100	23.00
27	野外采集	4500	100	66.67	33.33	100	100	24	1 000	100	22.22
29	野外采集	3000	100	100	96.67	10.34	66.67	26	175	87.50	5.83
31	野外采集	2100	100	100	100	70	47.62	42	680	97.14	32.40
33	野外采集	9000	100	100	100	75	4.4	40	150	50	1.67

除 18 号配对的受精率仅为 20%外，其他配对的受精率都＞95%。各配对后代孵化率高低不一，最高孵化率＞95%，最低的几乎全部无法出膜。

日本文昌鱼各组配对后代的生存率及变态时间差异也很大。在 7 个完成变态的家系中，生存率最高的为 31 号家系，达 32.4%，而最低的 33 号家系仅有 1.67%；变态最快的为 27 号家系，仅历时 24 d，其次是 24 号和 29 号家系，最慢的是 31 号家系，历时 42 d。

2.2 不同家系间早期发育模式的比较及成因

在所有亲本配对中，其中 24 个配对所产子代未能发育至 8 鳃裂即全部死亡，其余 10 个配对的曲线图走势显示各配对所产子代发育速度快慢不一，呈现出两种不同的发育模式（图 1）。第一种包括 24、25、26、27、28 及 29 号配对的子代，鳃裂数随日龄几乎呈匀速增长；第二种包括 5、11、31 及 33 号配对的子代，幼体发育过程中早期鳃裂数增长缓慢，有的甚至连续数日不形成新的鳃裂，后期鳃裂形成速度有所加快，但仍不及第一种模式。

为了探讨产生两种早期发育模式的原因是否由养殖条件不同所导致，对各家系的养殖条件进行比较，所有家系中，24、25、26、27 及 31 号家系是在相同条件下养殖，却进入了不同的早期发育模式，提示早期发育模式可能与亲本遗传性状有关。

2.3　家系畸形与死亡

27 个配对亲本的子代在培育过程中全部死亡，每个配对后代大量死亡时，均观察到异常现象，包括受精率低、孵化率低、胚胎畸形、水质恶化、日光暴晒、温度骤变以及变态期未及时铺沙和投喂的饵料被杂藻污染等，其中大部分配对后代的死亡伴随胚胎畸形或水质恶化现象。总体来看，前期获得的配对死亡时大多出现水质恶化现象，而后期获得的配对中大多观察到胚胎畸形率过高，不同原因导致家系死亡的比例见图 2。

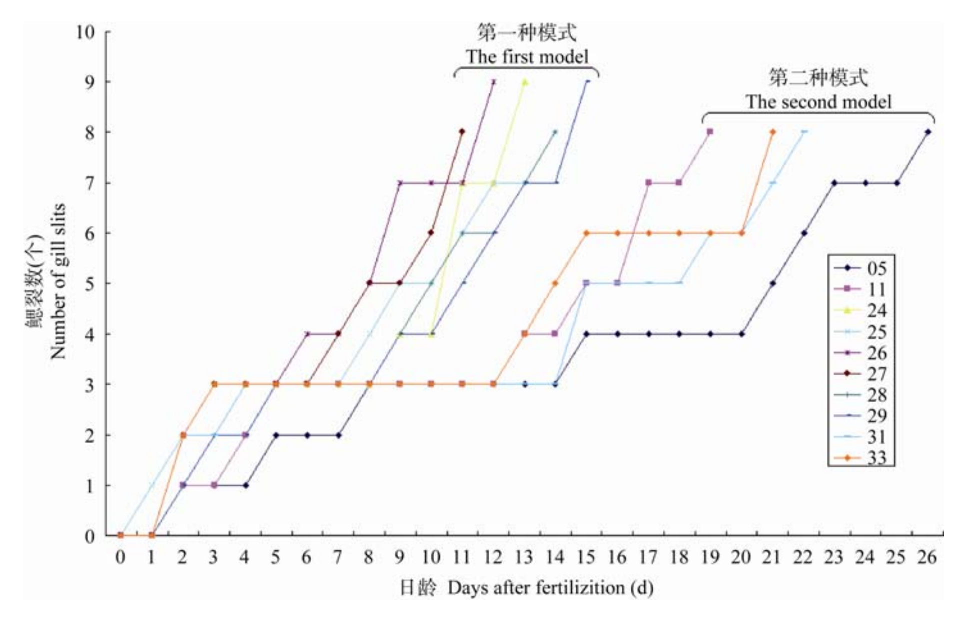


图 1　日本文昌鱼子代幼体的两种发育模式

Figure 1　Two different development patterns of *B. japonicum* larvae

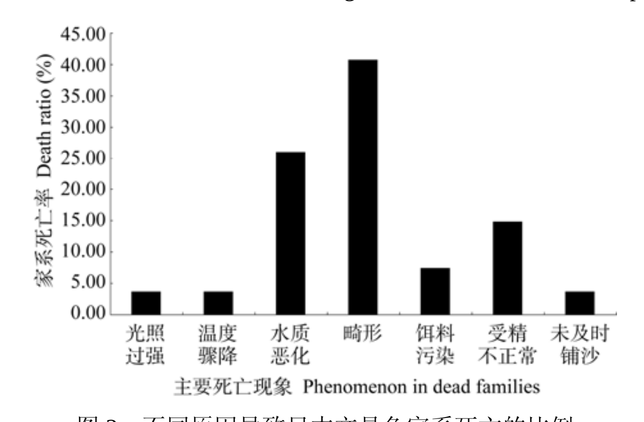


图 2　不同原因导致日本文昌鱼家系死亡的比例

Figure 2　Death ratio of amphioxus families caused by various factors

有 11 个配对亲本所产子代中出现了严重的胚胎发育畸形现象，畸形率＞90%，而且畸形的特征非常一致，主要特征是受精卵前三次卵裂时产生细胞间的粘连不紧密，甚至完全分离，各自独立发育为一个结构完整的较小胚胎，最终一枚受精卵形成两个或多个胚胎，到神经胚后期，两个或几个胚胎在受精膜内转动受阻，通常无法正常出膜而死亡，个别能够出膜的个体多出现幼体尾端粘连，最终不能存活。畸形胚胎发育过程见图 3。

为探求胚胎畸形的原因，我们用不同的授精方式（包括受精容器大小、受精时间长短、受精时所用精卵比例、受精时有无光照等）得到同一配对亲本的后代，在不同的条件下发育，其胚胎畸形率相当；而用相同授精方式得到的不同配对亲本的后代，在相同条件下发育，则畸形率相差甚远。通过设置以上对照实验，排除了人工授精操作和胚胎孵化条件造成胚胎畸形的可能性，由此推测这种畸形主要是由亲本遗传因素造成的，可能与精液或卵子质量不佳有关。而后我们用同一条雄鱼所产的精液同时给两尾雌鱼所产的卵子分别受精，在相同条件下孵化，受精后一直在解剖镜下观察，结果一组畸形率很高而另一组几乎没有出现畸形，因此确定这种畸形与雌性亲本产卵质量有直接关系。前期获得的 1~12 号配对中，大部分配对没有发现畸形现象，只在少数配对中出现个别畸形，并未对整个配对后代的存活造成大的影响，但最初配对的这些家系因管护经验不足而全部夭折；后期获得的 13~34 号配对中，较多的家系出现了高比率的畸形现象，随着管护经验的积累，其中有 7 对亲本所产家系成功培育至完成变态钻入沙中，此后的仔代死亡率就很低

了。实际上我们在诱导亲本产卵的操作过程中，在3月初，一次性将所有亲本都置于低温环境下养殖以备催产。与前期获得的亲本配对相比，后期配对的亲本在低温下养殖的时间达25天以上，因此雌性亲本在较低温度下长时间养殖可能是导致胚胎早期畸形率高的原因之一。

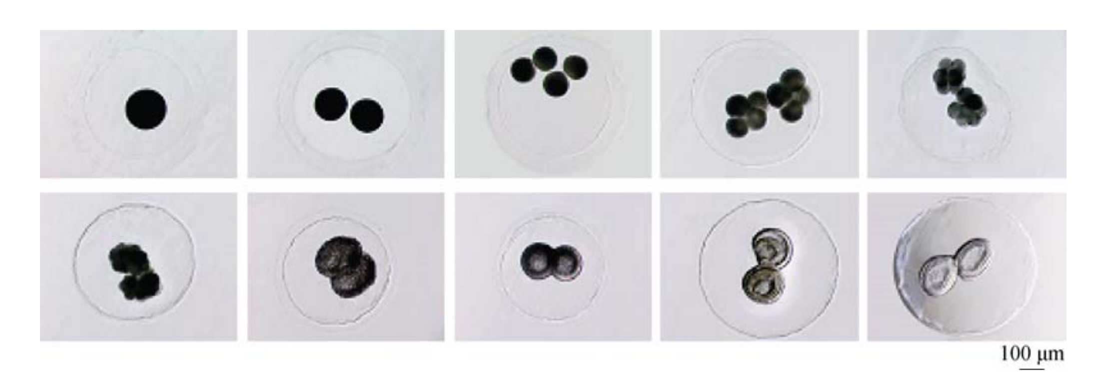


图3 日本文昌鱼畸形胚胎发育过程
Figure 3 Abnormal developmental embryos of *B. japonicum*

前期获得的3、4、6、7、9、11及12号等7个配对后代死亡时观察到水质恶化现象，包括两种不同的情况：有的家系明显可见水体中悬浮着很多杂藻和文昌鱼排泄物；有的肉眼观察不到明显的水质变化，将水滴置于镜下观察时可见水中杂质很多，水体不清澈。文昌鱼对水质变化非常敏感，一旦水质恶化，仔鱼立即停止进食，并在1~2 d内整个家系的个体全部死亡。早期水质恶化主要是海水中原有的杂藻、虫卵孵化、生长所致，后期水质恶化的原因主要有：投喂饵料时引入虫卵、文昌鱼排泄物积累、未吃完的藻类死亡分解，特别是当有部分仔鱼死亡后未及时清理，会导致水质很快恶化，引起文昌鱼大规模死亡。

编号为2、18、32、34号的4个配对的卵受精不正常，包括卵子、精子本身质量差造成的受精率低、受精后发育不良，完成受精后未及时去除多余精子导致的受精卵死亡。幼体养殖过程中曾有一段时间投喂的金藻中混入了很多角毛藻，角毛藻个体较大，而幼体的口较小，无法顺利吞食，因此投喂角毛藻会后造成口被堵塞，无法继续摄食，致使大量幼体死亡，其中8号和14号配对的幼体因饵料污染全部死亡。

在所有配对的家系中，5号家系第一个进入变态期，但当时桶底未及时铺沙，幼体试图钻沙时前端撞伤，停止摄食，最终全部死亡。10号家系在受精后的当晚，因加热棒夜间意外断电，水温下降至19 ℃，大量胚胎死亡，剩余胚胎发育成的幼体不能正常形成鳃裂，无法摄食，最终全部死亡。我们在初期的家系培育时，用半透明的塑料桶孵化仔鱼，只在正午光线太强时做遮光处理，但随着仔鱼的发育，其眼点数不断增加，感光能力增强，而仔鱼尚无钻沙能力，因光线过强对仔鱼的生长发育不利，导致大量死亡（如1号配对）。后改用深色的带盖的塑料桶，只留一个小孔透光、通气，未再出现因光线太强而导致仔鱼大量死亡的现象。

在最终存活的7个家系中，24、25、29号家系早期有一些胚胎畸形，24、25号家系畸形胚胎出膜前死亡，幼体孵化率不高，29号家系畸形胚胎存活至正常幼鱼开口，导致开口到3鳃裂期间死亡率很高，结果这三个家系的生存率低。33号家系3鳃裂至8鳃裂期间发育缓慢，死亡率高，导致最终生存率仅有1.67%。

3 讨 论

3.1 文昌鱼全同胞家系建立的可行性

建立全同胞家系是培育品系的重要途径，也是进行遗传性状分析和构建连锁图谱的重要材料，在遗传育种研究中起着重要作用，许多物种通过建立家系育成了新的品种（Thodesen et al, 2011），并建立了遗传连锁图谱（Petersen et al, 2012; Wilson et al, 2002）。使文昌鱼成为实验室模式动物，需要从野生群体中培育文昌鱼品系，但文昌鱼的人工繁殖初告成功，从受精卵培育到成体过程中死亡率非常高（Zhang et al, 2007），稍有不慎幼体在孵化或发育过程中即全部消亡，能否建立全同胞家系无任何经验可以借鉴。本研究结果表明，只要选择合适的亲

本配对，采用适当的养护措施，子代发育至完成变态的活率可大大高于前人的估测（Courtney, 1975），在本实验中成活率最高可达 32.4%，而且这一比率还有进一步提高的可能，因此文昌鱼家系建立是完全可行的。

我们在文昌鱼全同胞对家系培育过程中发现，不同家系间在孵化率、生长发育速度、成活率等方面的差异很大。因此通过建立全同胞家系，有目的的定向选育和杂交，可以培育遗传背景一致性高、生长发育快、成活率高等性状优良的文昌鱼品系，使文昌鱼成为真正的实验室模式动物。

3.2 发育模式与仔鱼存活的关系

此前的研究已发现日本文昌鱼 3 鳃裂阶段持续时间较长，~15 d，3 鳃裂幼体到 8 鳃裂幼体期间的死亡率极高，到幼体完成变态的时间需要 40~50 d（Zhang, 2007），这与本研究中的第二种发育模式相同。我们在家系培育的过程中还发现了日本文昌鱼早期发育的另一种模式，幼鱼 3 鳃裂期仅需数日，幼体完成变态的时间最短仅历时 24 d（27 号家系），这样的家系 3 鳃裂到 8 鳃裂阶段死亡率也较低，只要度过这一段艰难时期，幼体变态潜沙后存活力和适应力大大增强，死亡率低，群体的数量趋于稳定。因此在今后的品系培育工作中，选用第一种模式的亲鱼，可以缩短幼体培育时间，提高子代生存率，同时也表明第一种发育模式的文昌鱼更适合培育成为实验室模式动物。

3.3 文昌鱼幼体主要死因的解决办法

畸形胚胎使幼体孵化率大大降低，从而影响总存活率（如 24、25 号家系），甚至造成了大量家系死亡（13、15~17、19~23、28、30 号家系）。这些家系的雌性亲本在较低温度下长时间养殖可能是导致胚胎早期畸形率高的主要原因，因此在诱导产卵时，应将亲鱼分期分批地进行低温养殖，保证亲鱼在低温环境中少于 20 天，避免亲鱼产卵质量不佳而导致胚胎畸形。此外，由于剧烈震荡可能导致粘连本就不紧密的卵裂细胞更易分离，为降低胚胎畸形率，应注意受精后孵化的早期充气量不宜太大，避免水花翻腾过于激烈，受精卵密度不高时，也可静水孵化。

文昌鱼对水质变化特别是水的清洁度非常敏感，水体恶化后文昌鱼幼体停止摄食，并很快死亡。因此在养殖过程中必须每天测量水温和盐度，及时调节，保持各桶内海水温度 25~27 ℃，盐度 25‰~28‰，并每天观察水体清洁程度。为避免早期水质恶化，可将沙滤过的海水用单层新华滤纸再过滤一次，尽量去除杂质，每次孵育受精卵时应使用新鲜过滤的海水。为防止后期水质恶化引起文昌鱼大规模死亡，要每天观察水质变化情况，饵料投喂不可过量，一旦发现文昌鱼数量减少，要立即换水，避免大规模死亡发生。我们后期获得的家系由于采取了新鲜过滤海水并及时换水的方法，未再出现文昌鱼幼体因水质恶化而大量死亡的现象。

在前期进行家系培育时，部分仔鱼因光线太强而死亡，在张秋金等的研究中采用透明或不透明的养殖容器对成体和幼体进行培育，并未出现明显差异，但此项养殖实验是在光线较昏暗的房间中进行，需以日光灯辅助照明，而本研究的养殖房是墙壁和屋顶透明的阳光房，使用自然光线照明。因此，在文昌鱼仔鱼培育中需进行遮光处理，避免阳光直射。

参考文献：

Beaster-Jones L, Schubert M, Holland LZ. 2007. Cis-regulation of the amphioxus engrailed gene: Insights into evolution of a muscle-specific enhancer. *Mechanisms of Development,* **124**(7-8): 532-542.

Courtney WAM. 1975. The temperature relationships and age-structure of North Sea and Mediterranean populations of *Branchiostoma lanceolatum*. *Symposia of the Zoological Society of London,* **36**: 213-133.

Du Q, Cheng ZD. 1990. The artificial breeding of amphioxus. *Fujian Fisheries,* (3): 16-22. [杜琦, 程兆第. 1990. 文昌鱼人工育苗初探. 福建水产, (3): 16-22.]

Fuentes M, Schubert M, Dalfo D, Candiani S, Benito E, Gardenyes J, Godoy L, Moret F, Illas M, Patten I, Permanyer J, Oliveri D, Boeuf G, Falcon J, Pestarino M, Fernandez JG, Albalat R, Laudet V, Vernier P, Escriva H. 2004. Preliminary observations on the spawning conditions of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) in captivity. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution,* **302B**(4): 384-391.

Fuentes M, Benito E, Bertrand S, Paris M, Mignardot A, Godoy L, Jimenez-Delgado S, Oliveri D, Candiani S, Hirsinger E, D'Aniello S, Pascual-Anaya J, Maeso I, Pestarino M, Vernier P, Nicolas JF, Schubert M, Laudet V, Geneviere AM, Albalat R, Fernandez JG, Holland ND, Escriva H. 2007. Insights into spawning behavior and development of the European amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution,* **308B**(4): 484-493.

Garcia-Fernàndez J, Holland PWH. 1994. Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene-cluster. *Nature,* **370**(6490): 563-566.

Holland LZ, Holland ND. 2001. Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate?. *Journal of Anatomy*, **199**(Pt 1-2): 85-98.

Holland LZ, Yu JK. 2004. Cephalochordate (amphioxus) embryos: procurement, culture, and basic methods. *Methods in Cell Biology,* **74**: 195-215.

Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology. *Cellular and Molecular Life Sciences,* **61**(18): 2290-2308.

Holland ND, Holland LZ. 2010. Laboratory spawning and development of the Bahama lancelet, *Asymmetron lucayanum* (Cephalochordata): Fertilization through feeding larvae. *Biological Bulletin,* **219**(2): 132-141.

Li WY, Zhong J, Wang YQ. 2010. Analysis of amphioxus geographic populations in the west Pacific Ocean based on *COX I* gene. *Zoological Research,* **31**(4): 375-380. [李伟业, 钟婧, 王义权. 2010. 基于 *COX I* 基因的太平洋西岸文昌鱼地理种群分析. 动物学研究, **31**(4): 375-380.]

Mizuta T, Kubokawa K. 2004. Non-synchronous spawning behavior in laboratory reared amphioxus *Branchiostoma belcheri* Gray. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* **309**(2): 239-251.

Petersen JL, Baerwalda MR, Ibarrab AM, May B. 2012. A first-generation linkage map of the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*): Initial evidence of QTL for size traits and markers linked to orange shell color. *Aquaculture,* **350-353**: 200-209.

Poss SG, Boschung HT. 1996. Lancelets (*Cephalochordata: Branchiostomatidae*): how many species are valid?. *Israel Journal of Zoology,* **42**(Suppl.): S13-S66.

Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutiérrez EL, Dubchak I, Garcia-Fernàndez J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-I T, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PWH, Satoh N, Rokhsar DS. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature,* **453**(7198): 1064-1071.

Stokes MD, Holland ND. 1995. Embryos and larvae of a lancelet, *Branchiostoma floridae*, from hatching through metamorphosis: Growth in the laboratory and external morphology. *Acta Zoologica (Stockholm),* **76**(2): 105-120.

Stokes MD, Holland ND. 1998. The lancelet: Also known as "amphioxus", this curious creature has returned to the limelight as a player in the phylogenetic history of the vertebrates. *American Scientist*, **86**(6): 552-560.

Thodesen J, Rye M, Wang YX, Yang KS, Bentsen HB, Gjedrem T. 2011. Genetic improvement of tilapias in China: Genetic parameters and selection responses in growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after six generations of multi-trait selection for growth and fillet yield. *Aquaculture,* **322-323**(14): 51-64.

Wang Y, Zhao PS, Wang J. 2002. The comparison of the growth and development of the lancelets *Branchiostoma belcheri tsingtaunese* reared with natural and artificial seawater. *Natural Science Journal of Hainan University,* **20**(1): 62-66. [王嫣, 赵平孙, 王珺. 2002. 以人工海水和天然海水饲养的文昌鱼生长发育的比较. 海南大学学报(自然科学版), **20**(1): 62-66.]

Wang YQ, Fang SH. 2005. Taxonomic and molecular phylogenetic studies of amphioxus: a review and prospective evaluation. *Zoological Research,* **26**(6): 666-672. [王义权, 方少华. 2005. 文昌鱼分类学研究及展望. 动物学研究, **26**(6): 666-672.]

Wang YQ, Zhang QJ, Lü XM, Zhong J, Sun Y. 2006. Laboratory culturing and acquirement of the second filial generation of amphioxus. *Zoological Research,* **27**(6): 631-634. [王义权, 张秋金, 吕小梅, 钟婧, 孙毅. 2006. 文昌鱼的实验室繁育及子二代获得. 动物学研究, **27**(6): 631-634.]

Wilson K, Li YT, Whan V, Lehnert S, Byrne K, Moore S, Pongsomboon S, Tassanakajon A, Rosenberg G, Ballment E, Fayazi Z, Swan J, Kenway M, Benzie J. 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* with amplified fragment length polymorphism. *Aquaculture*, **204**(3-4): 297-309.

Wu XH, Zhang SC, Wang YY, Zhang BL, Qu YM, Jiang XJ. 1994. Laboratory observation on spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology,* **12**(4): 289-294.

Wu XH, Zhang SC, Wang F, Zhang BL, Qu YM, Wang HT. 1995. Laboratory culture of the amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) – effects of food and sand on larvae survival. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, **26**(Supplement): 134-136. [吴贤汉, 张士璀, 王峰, 张宝录, 曲艳梅, 王宏田. 1995. 青岛文昌鱼的实验室培育——饵料和沙对幼虫成活的影响. 海洋与湖沼, **26**(Supplement): 134-136.]

Yu JK, Satou Y, Holland ND, Shin-I T, Kohara Y, Satoh N, Bronner-Fraser M, Holland LZ. 2007. Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature,* **445**(7128): 613-617.

Zhang QJ. 2007. Taxonomy of Genus *Branchiostoma* in Xiamen Waters and Continuous Breeding of Two Lancelets in the Laboratory. Ph.D. thesis, Xiamen University. [张秋金. 2007. 厦门海域文昌鱼属 *Branchiostoma* 的分类及 2 种文昌鱼的实验室连续繁育. 博士学位论文, 厦门大学.]

Zhang QJ, Zhong J, Fang SH, Wang YQ. 2006. *Branchiostoma japonicum* and *B. belcheri* are distinct lancelets (Cephalochordata) in Xiamen waters in China. *Zoological Science,* **23**(6): 573-579.

Zhang QJ, Sun Y, Zhong J, Li G, Lü XM, Wang YQ. 2007. Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in the laboratory. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308B**(4): 464-472.

Zhang SC, Zhu JT, Li GR, Wang R. 2001. Reproduction of the laboratory-maintained lancelet *Branchiostoma belcheri tsingtaunese*. *Ophelia,* **54**(2): 115-118.

Zhong J. 2009. Molecular Systematics and Genetic Diversity of Two Lancelets in China Seas. Ph.D. Xiamen University. [钟婧. 2009. 中国海域两种文昌鱼分子系统学与遗传多样性研究. 博士学位论文, 厦门大学.]

Zhong J, Lü XM, Li G, Fang SH, Wang YQ. 2006. Mass cultivation of feed organism for amphioxus in laboratory. *Chinese Wild Plant Resources,* **25**(6): 44-47, 57. [钟婧, 吕小梅, 李光, 方少华, 王义权. 2006. 几种环境因子对叉鞭金藻种群增长的影响. 中国野生植物资源, **25**(6): 44-47, 57.]